

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

---



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08140675 A**(43) Date of publication of application: **04.06.96**

(51) Int. Cl

**C12N 9/24**  
**A23L 1/22**  
**// A23F 3/40**  
**C11B 9/00**  
**C11B 9/02**

(21) Application number: **06311281**(22) Date of filing: **22.11.94**(71) Applicant: **MITSUI NORIN KK**(72) Inventor: **SAKATA KANZO**  
**HARA MASAHIKO****(54) ENZYME FORMING TEA FLAVOR COMPONENT AND ITS PRODUCTION****(57) Abstract:**

**PURPOSE:** To obtain a new enzyme which can efficiently produce tea flavors effective for improving the flavor of food products using tea as a raw material by acting on the precursors of tea flavor to generate the tea flavor, which is obtained by extracting raw tea leaves with a buffer solution under agitation.

**CONSTITUTION:** This new enzyme named as  $\beta$ -primeverosidase producing tea flavor, acts on the extract containing tea flavor precursors extracted from raw tea leaves suspended and stirred in a buffer solution, where the enzyme acts on a tea flavor glycoside having primeverose (6-O- $\beta$ -xylosylglucose) or glucose in its saccharide moiety to hydrolyze them to give primeverose or glucose. Further, it acts on p-nitrophenyl  $\beta$ -glucoside

or p-nitrophenyl  $\beta$ -xyloside to liberate glucose or xylose, is stable by the treatment at pH4-7 at 37°C for 1 hour, the optimal pH is 4-6, and stable at pH6 for 1 hour at a temp. lower than 45°C, the optimal temperature is near 50° and has 61,000 molecular weight according to SDS-PAGE.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-140675

(43) 公開日 平成8年(1996)6月4日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C12N 9/24				
A23L 1/22		Z		
// A23F 3/40				
C11B 9/00		C		
		A		

審査請求 未請求 請求項の数2 FD (全4頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-311281

(22) 出願日 平成6年(1994)11月22日

(71) 出願人 591039137

三井農林株式会社

東京都中央区日本橋室町3丁目1番20号

(72) 発明者 坂田 完三

静岡県静岡市大谷836

(72) 発明者 原 征彦

静岡県藤枝市南駿河台2-2-7

(74) 代理人 弁理士 久保田 藤郎 (外1名)

(54) 【発明の名称】 茶香氣成分生成酵素およびその製造法

(57) 【要約】 (修正有)

【構成】 茶香氣成分生成酵素、 $\beta$ -プリメベロシダーゼおよび生茶葉に緩衝液を加えて攪拌し、抽出することを特徴とする該酵素の製造法。

【効果】 茶香氣成分生成酵素、 $\beta$ -プリメベロシダーゼは、生茶葉から簡便な操作により得られる。本酵素は、不揮発性の茶フレーバー前駆体からバランスのとれた茶フレーバーを効率よく生成できるので、茶飲料をはじめとして茶を素材とした食品のフレーバーの改善に有効に活用することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の理化学的性質を有する茶香氣成分生成酵素、 $\beta$ -プリメベロシダーゼ。

(1) 作用：茶香氣成分前駆体に作用して茶香氣成分を生成する。

(2) 基質特異性：糖部分にプリメベロース（6-O- $\beta$ -キシロシルグルコース）あるいはグルコースを持つ茶香氣成分配糖体に作用し、これを加水分解してプリメベロースやグルコースを生成する。また、 $p$ -ニトロフェニル $\beta$ -グルコシドや $p$ -ニトロフェニル $\beta$ -キシロシドに作用し、グルコースあるいはキシロースを遊離する。

(3) 至適pH：pH4～6

(4) pH安定性：37℃、1時間の処理においてpH4～7で安定

(5) 至適温度：50℃付近

(6) 熱安定性：pH6、1時間の処理において45℃以下で安定

(7) 分子量：61,000（SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動）

【請求項2】 生茶葉に緩衝液を加えて攪拌し、抽出することを特徴とする請求項1記載の $\beta$ -プリメベロシダーゼの製造法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、茶香氣成分生成酵素である $\beta$ -プリメベロシダーゼとその製造法に関する。この酵素は茶香氣成分前駆体に作用して茶香氣成分とプリメベロースを生成する。

## 【0002】

【従来の技術】食品において香りは味や色と共に非常に重要な要素の一つである。例えば、食品に美味しそうな香りがなければ、人は食欲が起こらないし、従来とは異なる香りに対しては敏感な反応を示す。しかしながら、食品の構成要素として重要な役割を担っている香り、すなわちフレーバー成分は食品中にごく微量しか存在せず、しかも揮発性が高く、不安定なものも多い。

【0003】茶飲料は人々に好まれ、市場に各種の製品が出回っており、最近のヒット商品の一つに挙げられている。しかし、その製造工程で茶フレーバーが揮発あるいは変化してしまい、茶飲料をフレーバーの面から見ると、必ずしも満足し得るものではない。一方、茶の香氣成分の研究は最近急速に進展し、リナロール、ゲラニオール、ベンジルアルコール、メチルサリシレート、2-フェニルエタノールなどの主要な紅茶フレーバーが茶葉中ではそれらの配糖体（前駆体）として存在することが示唆され[Phytochemistry, vol.20, p2145(1981), Agric. Biol. Chem., vol.54, p1023(1990)]、やぶきた種では(z)-3-ヘキセノール $\beta$ -D-グルコシドおよびベンジルアルコール $\beta$ -D-グルコシドが単離され[Ag

ic. Biol. Chem., vol.55, p1205(1991), Agric. Biol. Chem., vol.58, p592(1994)]、ウーロン茶からはゲラニオール、ベンジルアルコール、リナロールおよび2-フェニルエタノールの各 $\beta$ -プリメベロシド（6-O- $\beta$ -キシロシル $\beta$ -D-グルコシド）が単離されている[Phytochemistry, vol.33, p1373(1993), Biotech. Biochem., vol.58, p1532(1994)]。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、不揮発性の茶香氣成分前駆体から茶飲料に十分活用することのできる茶フレーバーを生成させることができる茶香氣成分生成酵素並びにその製造法を提供することである。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、茶香氣成分前駆体からバランスよく茶フレーバーを生成させる方法について検討を重ねた結果、生茶葉に存在するグリコシダーゼの1種である $\beta$ -プリメベロシダーゼが効率よく茶フレーバーを生成することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0006】すなわち、本発明は次の理化学的性質を有する茶香氣成分生成酵素、 $\beta$ -プリメベロシダーゼ並びに生茶葉に緩衝液を加えて攪拌し、抽出することを特徴とする上記 $\beta$ -プリメベロシダーゼの製造法に関する。

(1) 作用：茶香氣成分前駆体に作用して茶香氣成分を生成する。

(2) 基質特異性：糖部分にプリメベロース（6-O- $\beta$ -キシロシルグルコース）あるいはグルコースを持つ茶香氣成分配糖体に作用し、これを加水分解してプリメベロースやグルコースを生成する。また、 $p$ -ニトロフェニル $\beta$ -グルコシドや $p$ -ニトロフェニル $\beta$ -キシロシドに作用し、グルコースあるいはキシロースを遊離する。

(3) 至適pH：pH4～6

(4) pH安定性：37℃、1時間の処理においてpH4～7で安定

(5) 至適温度：50℃付近

(6) 熱安定性：pH6、1時間の処理において45℃以下で安定

(7) 分子量：61,000（SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動）

【0007】上記の理化学的性質を有する本発明の茶香氣成分生成酵素、 $\beta$ -プリメベロシダーゼの製造法について説明する。原料の茶葉は、その品種を問わずアッサム種、中国種、日本種などいずれのものであってもよい。また、使用する茶葉は新芽の部分でも古葉あるいはこれらの混合物であってもよいが、茶葉からの本酵素の抽出の簡便さから新芽を用いるのが好ましい。

【0008】本酵素の茶葉からの抽出は、一般的な植物酵素の抽出方法（瓜谷郁三、志村憲助、中村道徳、船津勝編、生物化学実験法14 高等植物の二次代謝研究

法(1981)学会出版センター;堀尾武一,山下仁平編、蛋白質・酵素の基礎実験法(1981)南江堂)により行えばよい。例えば、生茶葉の重量に対して1~20倍量の緩衝液を加え0~4℃で家庭用ミキサー、ホモジナイザー、ブレンダー等の攪拌手段を用いて1~3分ずつ数回に分けて生茶葉を磨砕することにより酵素を抽出することができる。なお、茶葉に多量に含まれるポリフェノール類による妨害を最小限にするためには、生茶葉の磨砕時にポリフェノール類の吸着、除去に使用される物質、例えば不溶性ポリビニルピロリドン(商品名:ポリクラAT、五協産業製)を茶葉重量と同量ないしそれ以上添加することが好ましい。また、別の方法として、生茶葉を4℃~20℃程度の低温下にアセトンやブタノールなどの有機溶媒と共に磨砕することによっても茶葉中のポリフェノール類を除去することができる。

【0009】このようにしてポリフェノール類を除去した茶葉粉末に緩衝液を加え0~4℃で1~3時間程度攪拌して、目的とする酵素を抽出することもできる。ここで、緩衝液としては各種のものが使用でき、例えばクエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、酒石酸緩衝液、コハク酸緩衝液、マレイン酸緩衝液、リン酸緩衝液、イミダゾール塩酸緩衝液、Tris-HCl緩衝液、ホウ酸緩衝液、クエン酸-リン酸緩衝液等を挙げることができる。

【0010】上記の方法によって得られた抽出物から残渣を除くために、濾過、遠心分離などの固液分離手段を適用して粗酵素抽出液とする。粗酵素抽出液からの本酵素の精製は、公知の分離・精製方法が適用できる。例えば、粗酵素抽出液から硫酸塩析法、有機溶媒沈殿法などにより粗酵素蛋白質を得、さらにこれをイオン交換、ゲル濾過、アフィニティー等の各種クロマトグラフィーを適宜組み合わせることによって精製酵素を得ることができる。

#### 【0011】

【実施例】以下に本発明を実施例によって説明するが、本発明はこれらにより何ら制限されるものではない。

##### 実施例1

生茶葉(やぶきた種)1kgにあらかじめ-20℃に冷却したアセトン4リットル(L)を加え、ホモゲナイザーにて3分間磨砕した。残渣を濾過して集め、これをアセトン1Lで3回洗浄後、真空デシケーター中で乾燥し、アセトンパウダー200gを得た。このアセトンパウダーを1Lの0.1Mクエン酸緩衝液(pH6.0)に懸濁させ、4℃で3時間攪拌して酵素を抽出した。抽出物を遠心分離して残渣を除去したのち、上清液に同量のアセトンを加え、蛋白質を沈殿させた。次いで、遠心

分離により沈殿物を集め、上記したクエン酸緩衝液300mlに溶解後、硫酸塩析を行った。

【0012】40~80%飽和硫酸画分に析出する沈殿物を遠心分離により集め、この沈殿物を少量の20mMクエン酸緩衝液(pH6.0)に溶解した後、同緩衝液を用いて4℃で一夜透析した。得られた粗酵素溶液を20mMクエン酸緩衝液(pH6.0)で平衡化したCM-トヨパール650Mカラムに展開し、イオン交換クロマトグラフィーを行った。カラムを上記緩衝液で洗浄後、0~0.5Mの塩化ナトリウムを含む同緩衝液で酵素を溶出した。

【0013】酵素活性は、p-ニトロフェニルβ-グルコシドを基質とし、遊離するp-ニトロフェノールを分光光度計で測定することによって調べた。また、酵素活性は1分間に1μmoleのp-ニトロフェノールを遊離する酵素量を1ユニットと定義した。図1にCM-トヨパールを用いたイオン交換クロマトグラフィーでの酵素の溶出パターンを示す。図から明らかなように、グリコシダーゼI~IIIが得られた。これら3画分を茶香気成分前駆体を含む粗画分と37℃で90分間反応させ、生成する茶香気成分組成をアセトンパウダーを用いたときに生成する香気成分組成と比較した。その結果、グリコシダーゼIIを用いたときに生成する香気成分組成がアセトンパウダーでの結果と最も類似していた。すなわち、グリコシダーゼII画分に茶香気成分生成酵素、β-プリメベロシダーゼが存在することが確認された。

【0014】次に、グリコシダーゼII画分を限外濾過により濃縮し、得られた濃縮液を20mMクエン酸緩衝液(pH6.0)で平衡化した陽イオン交換Mono-Sカラム(5×50mm)に展開し、上記緩衝液で溶出して茶香気成分生成酵素、β-プリメベロシダーゼの精製酵素標品を得た。以上の精製操作によって得られた酵素標品は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で均一であった。また、本酵素が前記した理化学的性質を有していることを確認した。

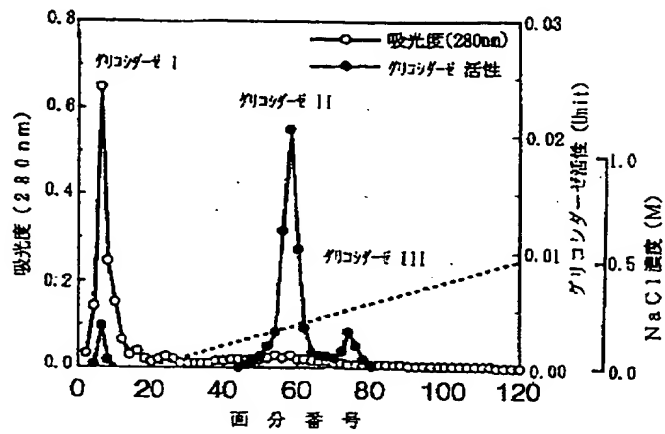
#### 【0015】

【発明の効果】本発明の茶香気成分生成酵素、β-プリメベロシダーゼは、生茶葉から簡便な操作により得られる。本酵素は、不揮発性の茶フレーバー前駆体からバランスのとれた茶フレーバーを効率よく生成できるので、茶飲料をはじめとして茶を素材とした食品のフレーバーの改善に有効に活用することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 CM-トヨパールを用いたイオン交換クロマトグラフィーでの酵素の溶出パターンである。

【図1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>

C11B 9/02

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所